



-Blunting and Ligation Kit-

# **Blunting high**

(Code No. BLK-101)

# 取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department OSAKA JAPAN

# — 目次 —

[1]	はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	(1)
[2]	キットに含まれるもの ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	(2)
[3]	プロトコール ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	(3)
	<ol> <li>平滑化反応の手順</li> <li>効率よい平滑化を行うために</li> <li>Ligation反応の手順</li> <li>効率よいLigationを行うために</li> </ol>	
[4]	ベンチサイド プロトコール ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	(6)
[5]	関連商品一覧	(7)

# ご注意

本キットに含まれる試薬類はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として 決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の 注意事項を厳守し、安全に留意してください。

# [1] はじめに

Blunting highは、DNA末端の平滑化と、それに続くLigationを行うことができます。本キットは、次のような特長を持っています。

- 1. KOD DNA Polymeraseを用いて平滑化を行います。
  - ●"KOD"は、超好熱始原菌 *Pyrococcus* sp.KOD1株由来の耐熱性 DNA Polymeraseです。本酵素の有する5'-3'polymerase活性と3'-5'exonuclease活性により、dNTPsの存在下でDNA末端を平滑化します。
- 2. 短時間の反応(2min)でDNAを平滑化します。
  - ●過剰に作用させても平滑化には影響はありません。
- 3. 簡便な操作で、高い効率のBlunt-end Ligationができます。
  - ●"Ligation high"は、1液タイプのLigation Kitです。高い効率のLigationができます。
- 4. 添付のControl DNAで、平滑化反応とLigation反応の確認ができます。

# [2] キットに含まれるもの

### キットのパーツ(20回分)

20μl KOD DNA Polymerase (2.5U/μl)

100µl 10XBlunting Buffer\*1

375µl Ligation high\*2

50µl Control DNA (10ng/µl)\*3

### \*110XBlunting Bufferの組成

1.2M Tris-HCl pH8.0 at 25°C

100mM KCI

15mM MgCl<sub>2</sub>

 $60 \text{mM} \quad (NH_4)_2 SO_4$ 

2mM dNTPs

1% TritonX-100

0.01% BSA

<sup>\*2</sup>Ligation highは、-DNA Ligation kit- Ligation high(LGK-101)と同じ組成です。

<sup>\*3</sup>Control DNAは、*EcoR* I と*Sph* I でdouble digestしたpUC18 DNAです。平滑化してLigationすると、アンピシリン耐性遺伝子をコードするplasmid DNAを形成します。

## [3] プロトコール

### 1. 平滑化反応の手順

(1)次の組成で反応液を調製します。

Sample反応		Control反応		
	(µI)		(µI)	
Sample DNA	Χ	Control DNA (10ng/µl)	5	
10XBlunting Buffer	1	10XBlunting Buffer	1	
KOD (2.5U/µl)	1	KOD (2.5U/µI)	1	
滅菌水	8-X	滅菌水	3	
	10		10	

- (2)72°C, 2min保持します。 (流動パラフィン、ミネラルオイル等の重層は必要ありません)
- (3) 氷中で冷却します。
- (4)反応液はそのままLigation反応に使えます。

### 2. 効率よい平滑化を行うために

(1) DNAの精製

エタノール沈殿などで、\*1TEバッファーに置換したDNAの使用を標準的な操作としていますが、次の方法でも可能です。

●制限酵素処理したDNAの場合:

H,M,L,TAバッファーを用いた反応液であれば、反応液をそのままDNA溶液として用い、上の反応組成で平滑化処理できます。

◆TagでPCRした産物の場合:

PCR後の反応液を一部取り、KODを添加し、72℃, 2min処理します。

このとき、KODは、Taqと同じUnit数を加えます。dNTPsは、反応時の濃度で0.2mMが至適ですので、不足している場合は追加します。10XBlunting Bufferの添加は必要ありません。

<sup>&</sup>lt;sup>\*1</sup>TEバッファー : 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0

#### (2)DNA量

●DNA末端10pmolを処理できます。直鎖状pUC18 DNA2.7kbであれば、約10µgに相当します。DNA溶液は、最高8µlまで処理できます。

#### (3)反応液の調製

●反応液を調製するとき、KODを最後に加えてください。dNTPsが共存しない環境下ではKODの3'-5'exonucleaseが強く作用し、DNAを削ることがあります。

#### (4)反応時間

●72℃, 2minで充分な平滑化反応が行われます。また、標準の反応条件であれば、 30minまで時間を延長しても効率は変わりません。

### 3. Ligation反応の手順

(1)次の組成で反応液を調製します。

Sample反応		Control反応	
(µI)			(µI)
平滑化したSample DNA	Υ	平滑化したControl DNA	2
(平滑化反応液)		(平滑化反応液 5ng/µl)	
TEバッファー	10-Y	TEバッファー	8
Ligation high	10	Ligation high	10
	20		20

- (2)16°C, 1hr保持します。
- (3) Control 反応は、次のように進めます。
  - ●LigationしたDNAで、E.coliコンピテントセルを形質転換します。
  - ●アンピシリン含有LB寒天培地にて37°C, overnight培養します。 平滑化してLigationしたControl DNAの形質転換体は、アンピシリン耐性を有しコロニーを形成します。

Control DNAを平滑化してLigationしたときのcfu(colony formation unit)は、平滑化せずにLigationしたときの20倍以上になります。

### 4. 効率よいLigationを行うために

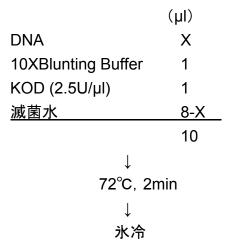
- (1)Ligation highの使用方法
- ●本品は-20℃で保存してください。
- ●Ligation highの融解を氷中で行います。5~10minで自然融解します。
- ●DNA液量と同量のLigation highを混合します。
- ●16°Cにて反応を行います。
- ●反応液は、反応終了後そのまま形質転換に使用できます。

#### (2)反応条件

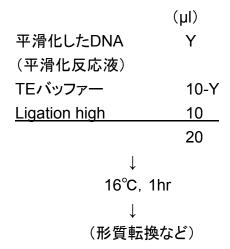
- ●Ligation反応の16℃以下では、KODはほとんど作用しませんので、KODを失活させる必要はありません。
- ●Controlの反応組成であれば、Ligation反応は16℃, 1hrで最大の効率に達します。
- ●Ligation highの標準的な使用方法は、反応を16°C, 30minとしていますが、本キットの反応が平滑末端のLigationであることと、平滑化反応液組成の持ち込みが反応を阻害することから、1hrの反応時間をお薦めします。
- ●また、DNA量、あるいは、Ligation反応組成に持ち込む平滑化反応液の量が多く なると、効率が低下する要因になります。
  - このような場合、反応時間を延長するか(overnightまで)、平滑化反応液をエタノール沈殿などでTEバッファーに置換すると、効率が改善されます。

# [4] ベンチサイド プロトコール

# 1. 平滑化反応



### 2. <u>Ligation反応</u>



# [5] 関連商品一覧

商品名	Code No.
KOD DNA Polymerase	KOD-101
Ligation high	LGK-101
T4 DNA Polymerase	TPL-101
Klenow Fragment	PLA-111
T4 DNA Ligase	LGA-111
T4 Polynucleotide Kinase	PNK-111
Alkaline Phosphatase( <i>E.coli</i> )	BAP-111
Alkaline Phosphatase(Calf intestine)	CAP-101
Competent high <i>E.coli</i> JM109	DNA-900
Competent high <i>E.coli</i> DH5	DNA-901
Competent high <i>E.coli</i> DH5α	DNA-903





#### 【製造・販売元】

-納期・注文に関するお問い合わせ-

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪) 〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833 E-mail: order\_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京) 〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目17番10号 住友商事京橋ビル TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951 E-mail: order\_lifescience@toyobo.jp

-製品の内容・技術に関するお問い合わせ-

#### テクニカルライン

TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833

開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝を除く)

E-mail: tech\_osaka@toyobo.jp [URL] http://www.toyobo.co.jp/bio